



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C12N 15/12, C07K 14/47, G01N 33/68, C12Q 1/68, C12N 15/62, C07K 16/18</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/08148</b>
			(43) Date de publication internationale: 17 février 2000 (17.02.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01908		(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 2 août 1999 (02.08.99)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 98/09997 4 août 1998 (04.08.98) FR			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNOLOGIE MOLECULAIRE-ADIM [FR/FR]; 22, rue Méchain, F-75014 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): ELBAZ, Nathalie [FR/FR]; 7, passage des Italiens, F-93170 Bagnolet (FR). NAHMIAS, Clara [FR/FR]; 4, rue Bailly, F-75003 Paris (FR). STROSBERG, Arthur, Donny [FR/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: NUCLEIC SEQUENCES CODING FOR AN AT2 INTERACTING PROTEIN INTERACTING WITH THE AT2 RECEPTOR AND THEIR APPLICATIONS

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR UNE PROTEINE (ATIP) INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2 ET LEURS APPLICATIONS

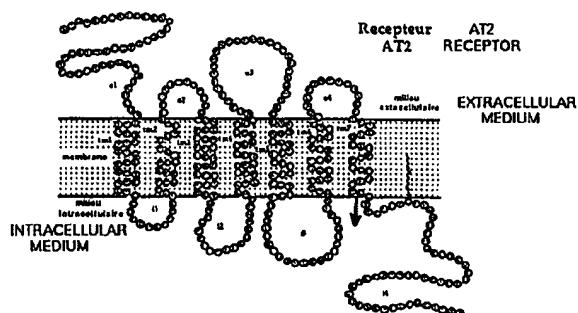
(57) Abstract

The invention concerns nucleic sequences coding for a protein capable of interacting with the AT2 receptor, oligonucleotides included in said sequences, their applications as probes and for expressing said proteins, vectors useful for said expression, host cells containing said vectors, and study model of AT2 receptor. The invention also concerns said proteins and their uses. Said isolated nucleic acid fragment coding for a protein capable of binding with the AT2 receptor is selected among the group consisting of the sequences SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 and 9.

(57) Abrégé

Séquences nucléiques codant pour une protéine apte à interagir avec le récepteur AT2, oligonucléotides compris dans lesdites séquences, leurs applications en tant que sondes et pour l'expression desdites protéines, vecteurs utiles pour ladite expression, hôtes cellulaires contenant lesdits vecteurs, ainsi qu'un modèle d'étude du récepteur AT2. Protéines ainsi que leurs applications. L'édit fragment d'acides nucléiques isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9.

C-TERMINAL END AT2 RECEPTOR  
LOCUS Extrémité C-terminale récepteur AT2 160 BP DS-DNA  
ORGANISM Souris MOUSE  
BASES 41 A 33 C 36 G 50 T  
ac.nucléiques 1 TGTGTTAAC CTTCTCTGTA TTGTTTTGTT GGAAACCGCT  
NUCLEIC ACIDS TCCAAAGAAA CGTCCCGAGT GTGTTTAGAG TTCCCATATAC  
TGGCTCCAA GGCAAGAGAG AGACTATGTC TTGAGAGAAA  
121 GGCAGTCTC TTAGAGAAAT GGACACCTT GTGTCTTAAA  
TRANSLATION INTO AMINOACIDS  
Traduction en acides aminés  
CVNPFLYCV GNRFQQNVRS VFRVPITWLQ GKRETMSCRK  
GSSLREMDTFVS\*



***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR UNE PROTEINE (ATIP) INTERAGISSANT AVEC LE RECEPTEUR AT2  
ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à des séquences nucléiques 5 codant pour une protéine apte à interagir avec le récepteur AT2, à des oligonucléotides compris dans lesdites séquences, à leurs applications en tant que sondes et pour l'expression desdites protéines, aux vecteurs utiles pour ladite expression, aux hôtes cellulaires contenant lesdits vecteurs, ainsi qu'à un modèle d'étude du récepteur AT2.

10 La présente invention est également relative aux dites protéines ainsi qu'à leurs applications.

L'octapeptide angiotensine II, principalement connu comme régulateur de la pression artérielle, a également été décrit comme un important modulateur de la croissance cellulaire. De façon intéressante ce peptide 15 semble exercer des effets opposés sur la croissance cellulaire, selon qu'il se lie sur l'un ou l'autre de ses deux sous-types de récepteurs membranaires (AT1 ou AT2).

Le récepteur de sous-type AT2, qui appartient aussi à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, est encore mal caractérisé tant 20 du point de vue de ses mécanismes d'activation que de son rôle physiologique (C. Nahmias et al., *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16, 223-225). Plusieurs arguments suggèrent cependant un rôle de ce récepteur dans les phénomènes de prolifération, de différenciation ou d'adhésion cellulaire.

Le récepteur AT2 est fortement exprimé au cours de la vie 25 foetale, disparaît chez l'adulte dans la plupart des tissus, mais se trouve réexprimé dans des conditions pathophysiologiques impliquant la restructuration des tissus.

Des études réalisées *in vivo* ont mis en évidence le rôle inhibiteur exercé par le sous-type AT2 sur la prolifération des cellules musculaires 30 de l'intima, après lésion vasculaire (P. Janiak et al., *Hypertension*, 1992, 20, 737-

745 ; M. Nakajima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 10663-10667).

Par ailleurs, la stimulation du récepteur AT2 active la phosphatase SHP-1 (Bedecs K. et al; *Biochem. J.*, 1997, 325, 449-454). Le fait que le récepteur AT2 active une phosphatase est en accord avec ses effets antiprolifératifs.

Compte tenu de ce qui précède, il a été montré que sur des cellules en culture, le récepteur AT2 :

- inhibe la synthèse d'ADN et la prolifération, induites par l'angiotensine II (Ang II) et le bFGF (M. Stoll et al., *J. Clin. Invest.*, 1995, 95, 651-657),

- induit l'apoptose (T. Yamada et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 156-160) et

- induit la différenciation neuronale (L. Laflamme et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 22729-22735).

15 L'étude des voies de signalisation, associées au récepteur AT2, a été abordée dans les cellules de la lignée N1E-115, dérivées d'un neuroblastome murin, qui n'expriment que le sous-type AT2. Une première étude a permis de mettre en évidence une déphosphorylation rapide et transitoire de certaines protéines sur résidus tyrosine, suite au traitement des cellules N1E-20 115 par l'angiotensine II (C. Nahmias et al., *Biochem. J.*, 1995, 306, 87-92). Il a également été montré que le récepteur AT2 interfère avec les voies d'activation des récepteurs aux facteurs de croissance et inhibe l'activité des MAP kinases (ERK1 et ERK2) (*mitogen-activated protein*), qui jouent un rôle clé dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire. L'effet 25 inhibiteur de l'AT2 sur l'activation des MAP kinases est rapide et transitoire, ne fait pas intervenir une protéine régulatrice sensible à la toxine pertussique (de type Gi/Go), mais implique l'activation d'une tyrosine phosphatase sensible à l'orthovanadate.

Compte tenu du rôle du récepteur AT2 sur la prolifération 30 cellulaire, les Inventeurs ont cherché à mettre au point des outils aptes à régu-

ler l'action du récepteur AT2. En effet, l'activation du récepteur AT2 peut avoir des répercussions en cancérologie (inhibition de la prolifération cellulaire).

De manière générale, le récepteur AT2 présente des effets 5 inverses de ceux de l'AT1 sur l'activation des MAP kinases et sur la prolifération cellulaire ; l'étude de la communication qui peut exister entre ces deux sous-types de récepteurs, liant le même ligand, présente par conséquent de l'intérêt.

L'étude des voies de signalisation et de la régulation du récepteur AT2 représente également un enjeu important pour la santé humaine 10 sachant qu'aujourd'hui des antagonistes du récepteur AT1 sont administrés aux patients atteints d'hypertension. Dans ce contexte il devient essentiel de connaître les effets biologiques associés au récepteur AT2 qui reste activable par l'Ang II circulante dans ce type de traitement.

15 La présente invention a pour objet un fragment d'acides nucléiques (ADN ou ARN) isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9, telles que présentées dans la liste des séquences, incluse dans la présente Demande.

20 Ces différentes séquences correspondent à l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une partie ou la totalité de la protéine ci-après dénommée ATIP (*AT2 interacting protein*).

La séquence SEQ ID NO:1 (1803 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ATIP de souris et inclut aussi bien les parties codant 25 pour la protéine de liaison au récepteur AT2 que les parties non codantes.

La séquence NO:3 (1323 pb) correspond à la séquence en acides nucléiques de la partie codante de la séquence SEQ ID NO:1, alors que la séquence SEQ ID NO:5 correspond au fragment de la séquence NO:1, obtenu par la technique du double-hybride (A. Plessis et al., M/S, 1994, 9, I-30 1K ; J. Luban et al., *Curr. Op. Biotechnol.*, 1995, 6, 59-64).

La séquence SEQ ID NO:7 (3742 pb) correspond à la séquence nucléique complète de l'ADNc humain et inclut aussi bien les parties codant pour la protéine homologue de l'ATIP de souris que les parties non codantes.

La séquence SEQ ID NO:9 (1308 pb) correspond à la partie 5 codante de la séquence SEQ ID NO :7.

La présente invention a également pour objet des transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires des séquences conformes à l'invention et sont notamment générés à partir desdites séquences.

La présente invention a en outre pour objet des fragments 10 desdites séquences comprenant entre 20 et 400 pb, utiles comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9, ou de séquences homologues.

Parmi lesdits fragments, on peut notamment citer une sonde 15 de 354 pb, (SEQ ID NO:5) ainsi que tout fragment de 20 pb à 400 pb inclus dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

Comme amorce, on utilisera en particulier la séquence SEQ ID NO:10 (oligonucléotide antisens), qui permet notamment d'amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP (technique du 5' RACE : Marathon cDNA amplification kit, Clontech).

20 On peut également utiliser comme amorces d'amplification, tout couple d'oligonucléotides de plus de 20 pb et comprenant une partie de la séquence nucléique ATIP (humaine ou de souris), notamment le couple SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:12.

Les conditions préférées d'hybridation (préhybridation et 25 hybridation) sont notamment les suivantes : 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à une stringence correspondant au tampon : SSCX1, 0,1 % SDS.

La présente invention a également pour objet une protéine 30 purifiée et isolée, dénommée ATIP, apte à interagir avec le récepteur AT2,

sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8.

Les séquences murines et humaine présentent 85,6 % d'homologies. La séquence humaine (ATIP humain) possède 5 aminoacides de 5 moins que la séquence de souris (ATIP souris). Les acides aminés manquants dans la séquence humaine se situent au niveau des acides aminés : 162, 163, 164, 166 et 214 de la séquence ATIP souris.

Les comparaisons (Blast) entre les séquences protéiques ATIP selon l'invention et les séquences contenues dans les banques de données 10 indiquent que ATIP humain (comme ATIP souris), ne présentent jamais plus de 25 % d'homologie avec une séquence connue, et cela, seulement sur une partie de cette séquence.

La présente invention a également pour objet un produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique 15 conforme à l'invention.

La présente invention a en outre pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre la protéine ATIP ou un fragment de protéine ATIP selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un vecteur 20 recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur tel que défini ci-dessus.

25 Parmi les cellules transformées préférées selon l'invention, on peut citer *E. coli* et les cellules CHO.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au moins deux vecteurs qui 30 codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le

groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites cellules, elles sont notamment constituées :

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à

l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

- soit par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un poly-

peptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection,

(b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon 5 l'invention, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

Une telle méthode met notamment en œuvre la technique dite du triple-hybride ou du double-hybride inverse, telles que décrites dans Vidal et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 10315-10320 et 10321-10326) ou 10 Tirode et al. (*J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 22995-22999).

La présente invention a également pour objet une méthode de criblage de polypeptides interagissant avec la protéine ATIP selon l'invention, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable 15 avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon l'invention, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide 20 correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

25 (b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant avec la protéine ATIP, sur un milieu sélectif convenable.

Une telle méthode permet notamment de rechercher d'autres protéines interagissant avec la protéine ATIP, en particulier pour trouver les maillons suivants de la voie activée par le récepteur AT2, en vue de les utiliser 30 pour modifier l'interaction protéine selon l'invention-récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable 5 avec deux vecteurs, tels que définis ci-dessus, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un 10 fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des 15 marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction ATIP-récepteur AT2.

Une telle méthode permet d'identifier et de délimiter les domaines importants de la protéine ATIP ou de l'extrémité C-terminale du 20 récepteur AT2, dont dépend leur interaction, afin de les utiliser comme cible privilégiée pour modifier la signalisation du récepteur AT2.

La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support 25 avec une protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

30 (c) la visualisation de l'éventuelle interaction ATIP-récepteur

AT2, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés soit contre la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2, soit contre le récepteur AT2.

Si la substance à tester inhibe l'interaction ATIP-récepteur

5 AT2, l'étape de visualisation est négative.

Conformément à l'invention l'ATIP est fixée sur ledit support soit de manière covalente, soit par liaison d'affinité entre une substance de fixation fusionnée à l'ATIP et ledit support. Par exemple, ledit support est constitué de billes couplées, soit à une substance présentant une affinité avec 10 ladite protéine de fixation, fusionnée à l'ATIP, soit à des anticorps convenables.

La protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette est notamment obtenue à partir d'un lysat de cellules transfectées avec un vecteur exprimant la protéine de fusion AT2-protéine étiquette.

15 En variante, ladite méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon l'invention, comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,

20 (b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable,

(c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps appropriés et

25 (d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagissant avec la protéine ATIP.

Conformément à ladite méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon l'invention-récepteur AT2, il est possible d'utiliser notamment comme protéines de fusion ATIP-protéine étiquette, les protéines GST-ATIPc et MYC-ATIPc, qui constituent des outils 30 pouvant permettre d'entraîner *in vitro* d'éventuelles protéines interagissant

avec ATIP, par exemple, à partir de lysats cellulaires activés ou non par des ligands du récepteur AT2. La protéine GST-ATIP peut-être entraînée par interaction spécifique du GST avec des billes d'agarose couplées à de la glutathione, ou encore immunoprécipitée avec l'anticorps anti-ATIP. La protéine 5 Myc-ATIP peut-être immunoprécipitée avec les anticorps anti-MYC commerciaux ou avec l'anticorps anti-ATIP.

L'intérêt de ces méthodes consiste à trouver des moyens de modifier la signalisation, le niveau d'expression ou la pharmacologie du récepteur AT2, ceci pouvant avoir des applications thérapeutiques. En effet 10 lorsqu'une pathologie aura été corrélée de façon claire à une anomalie de la transduction associée au récepteur AT2, une modification de cette transduction, en particulier en jouant sur la liaison du récepteur AT2 à la protéine selon l'invention, pourra alors éventuellement compenser le désordre pathologique ou au moins l'influencer.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation des cellules co-transformées précitées, pour la sélection et le criblage de substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend 20 encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 correspond à l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris, utilisée comme appât en double hybride pour cibler une 25 banque d'ADNc de souris ;

- la figure 2 illustre la position du domaine de liaison GAL4 et le site de clonage multiple du plasmide pGBT9 (Clontech) ;

- la figure 3 illustre les structures présumées *coiled-coil* (surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP de souris ;

30 - la figure 4 illustre les structures présumées *coiled-coil*

(surenroulées) (domaines *coiled-coil* soulignés) de l'ATIP humaine ;

- la figure 5 illustre la structure du plasmide pVP16 ;
- la figure 6 illustre le site de clonage multiple du plasmide

pRSET A ;

- 5 - la figure 7 illustre la séquence MYC utilisée, pour construire le plasmide pcDNA3-MYC ;

- la figure 8 illustre la structure du plasmide pBAC-PAK-poly HIS,

- 10 - la figure 9 illustre un Northern blot de plusieurs tissus humains hybridés avec la sonde ATIPsouris-court (SEQ ID NO:5) ;

- la figure 10, illustre l'interaction *in vitro* de la protéine ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 ; et

- la figure 11 illustre les modifications du signal induit par le récepteur AT2 par surexpression de la protéine ATIP.

15 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

**EXAMPLE 1 : Mise en évidence d'une interaction protéine-protéine spécifique entre le récepteur AT2 et la protéine de séquence SEQ ID NO:6 selon**

20 **l'invention.**

#### **Matériel et méthodes**

- Le système double-hybride, initialement développé par Song et Fields en 1989 (Nature, 340, 245-246) repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes ne nécessite que deux domaines : un domaine activateur qui n'a pas la capacité de lier l'ADN et un domaine de liaison à l'ADN.

Dans le système double-hybride, le domaine de liaison de l'ADN est fusionné à une protéine X et le domaine d'activation est fusionné à une protéine Y. Si, et seulement si, X et Y interagissent, un complexe est formé

30 qui reconstitue un facteur de transcription fonctionnel.

- Construction des vecteurs d'expression :

. vecteurs « appâts »:

5 Protéine X : extrémité C-terminale de la séquence codant pour le récepteur AT2 de souris (52 aminoacides de CVNPF au codon stop, voir figure 1), fusionnée à la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (figure 2).

10 Insert : extrémité du récepteur AT2 de souris (159 pb + 16 pb de sites générés par PCR) inséré au niveau des sites EcoRI et BamHI des vecteurs pLEX9 (Clontech) ou pGBT9 (pBTM116 ou pGAD424 modifié; A.B. Vojtek et al., *Cell*, 1993, 74, 205-214).

On obtient ainsi la séquence suivante :

CGGAATTC coté 5'-AT2 séquence C-terminale de 52 acides aminés-  
GGATCCCG coté 3'

. Banque criblée :

15 Banque d'ADNc de fœtus de souris (A.B. Vojtek et al., *Cell*, 1993, 74, 205-214), contenant des inserts de 350 à 700 pb (protéine Y) dans le vecteur VP16 (figure 5).

. Vecteurs contrôles « appâts »

20 Protéine X : extrémité C-terminale des récepteurs  $\beta$ 2-adrénnergique humain, AT1 de rat ou bradykinine humain.

. Souche de levure transformée

HF7c (Clontech) pour l'appât construit dans pGBT9 ;  
L40 pour l'appât construit dans pLex9.

### Résultats

25 Cette stratégie a permis d'isoler un clone issu de la banque d'ADNc contenant un insert de 354 pb (ATIP) qui interagit de façon spécifique avec l'extrémité C-terminale de l'AT2. Il est intéressant de noter que le criblage de cette banque avec les constructions réalisées dans les deux vecteurs d'expression pGBT9 et pLEX9 a permis de retrouver dans les deux 30 cas ce même clone. Ce clone n'interagit pas avec des protéines contrôles,

d'interactions non spécifiques.

Pour juger de la sélectivité de cette interaction, le clone ATIP a été testé en double-hybride avec les extrémités C-terminales des récepteurs :  $\beta$ 2 adrénérique humain, AT1 de rat et bradykinine humain, et toutes ont donné des résultats négatifs. Ceci indique que le polypeptide codé par le clone ATIP interagit, de façon sélective, avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris.

**EXEMPLE 2 : Caractérisation du clone ATIP.**

Pour rechercher le clone entier correspondant, une sonde de 354 pb (SEQ ID NO:5), qui correspond à l'insert obtenu par digestion avec l'enzyme de restriction NotI du plasmide isolé en double hybride (celui extrait de la banque VP16, sélectionné comme positif dans le cible utilisant comme appât, l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 de souris), est utilisée pour cribler une banque d'ADNc de fœtus de souris construite avec des inserts de taille supérieure à 1 kb. Deux clones chevauchants, comprenant la séquence ATIP, ont ainsi été identifiés et ont permis de séquencer 1803 pb de l'ADNc correspondant (SEQ ID NO:1). Cette séquence contient une phase ouverte de lecture de 1323 pb (SEQ ID NO:3) codant potentiellement pour une protéine de 440 acides aminés (SEQ ID NO:2 et 4). Les comparaisons entre la séquence protéique identifiée et les séquences contenues dans les banques de données indiquent que celle-ci ne présente jamais plus de 25 % d'homologie avec une partie d'une séquence connue.

La sonde de 354 pb (SEQ ID NO:5) a été utilisée comme sonde en Southern et Northern de façon très satisfaisante dans les conditions d'hybridation ci-après : préhybridation et hybridation en 45 % formamide, 9 % Dextran-sulfate, 0,2 % BSA, 0,2 % polyvinyl pyrrolidone, 0,2 % Ficoll, 0,1 % sodium pyrophosphate, 0,01 % SDS, 0,05 mM Tris pH 7,5, 0,9 M NaCl et rinçages jusqu'à stringence : SSCX1, 0,1% SDS.

En parallèle, des expériences d'hybridation de Northern blot effectuées sur des ARN totaux de cellules N1E-115 avec la sonde ATIP (SEQ

ID NO:5) confirment l'expression de l'ARNm correspondant dans les cellules N1E-115, et indique l'existence d'au moins 5 transcrits de tailles différentes. Ces transcrits correspondent à des épissages alternatifs d'un même gène ou à des gènes différents homologues.

5 Sur un Northern, effectué dans les conditions décrites dans la littérature sur un échantillon de 5 µg d'ARN poly A+ de cellules N1E-115, les tailles des différents transcrits hybridant avec la sonde ATIPsouris sont = 2,5-3,5-5-5,3 et 7,5 kb.

La figure 9 représente un Northern blot contenant des ARN 10 poly A+ de différents tissus humains, hybridés avec la même sonde ATIPsouris. On peut constater que l'ATIP est exprimé de façon ubiquitaire. On trouve dans tous les tissus représentés un transcrit majoritaire à 4,4 kb, auquel s'ajoute, selon les tissus, d'autres transcrits plus longs (pancréas et cœur) ou plus courts (pancréas, muscle squelettique, placenta, cerveau et 15 cœur). Ceux-ci sont peut-être le fruit d'un épissage alternatif de l'ARN de ATIP qui serait dépendant du tissu considéré ou encore ils sont le signe de l'existence d'une famille d'ARN codant pour des protéines de "la famille ATIP", homologues de ATIP et qui sont révélés par la sonde, à la stringence utilisée.

20 Afin de connaître la taille du plus petit transcrit codant pour l'ATIP, une amplification rapide des extrémités d'ADNc (RACE 5', Marathon cDNA Amplification Kit de Clontech) à partir d'ARN poly A+ de cellules N1E-115 a été réalisé, en utilisant l'oligonucléotide antisens de SEQ ID NO:10, pour amplifier les parties 5' des différents ARNm correspondant à l'ATIP endogène 25 des cellules N1E-115 (neuroblastome murin).

Les résultats obtenus ont indiqué que le plus petit transcrit incluant le domaine ATIP est un ARNm de 1950 pb, qui contient bien le début de la séquence codante obtenue par clonage.

Tout autre couple d'oligonucléotides (amorces) de plus de 20 30 pb et comprenant une partie de la séquence ATIP, peut également être utilisé

pour amplifier par PCR (conditions de PCR à déterminer pour chaque couple d'oligonucléotides à l'aide du logiciel OLIGO 4) une partie de l'ATIP (et donner un fragment d'ADN qui pourrait éventuellement être utilisé comme sonde pour reconnaître l'ADN ou l'ARN correspondant à l'ATIP).

5 **EXEMPLE 3 : Construction de différents vecteurs selon l'invention**

D'une façon générale les vecteurs contenant ATIPsouris-court (à l'exception de pRSETA-ATIPsouris-court) ont été obtenus à partir d'un insert produit par PCR avec les deux oligonucléotides suivants (SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12):

10 oligo. sens: 5' CGCGGATCCCAGACAGACCGGACGGAACTGGAG 3'  
 oligo. antisens: 5' CCGGAATTCACTACAACCTTCGTTAAAGCATC 3',  
 en utilisant comme matrice le vecteur VP16-ATIPsouris-court (figure 5). Par commodité, ce vecteur est dénommé  $\beta$ ATIP $c^{stop,E}$ . En effet, digéré par BamHI et EcoRI, il donne un insert correspondant à la séquence

15 1er brin: GATCC-SEQ ID NO:5 (moins CAT) -TAGTG  
 2ème brin: CCTAG-----CTTAAG  
 Site BamHI (STOP) Site EcoRI

20 D'autres vecteurs peuvent également être construits ; ils comprennent tout ou partie de la protéine ATIP et sont les suivants :

-VP16-ATIPsouris-court (vecteur sorti de la banque criblée en double hybride, comprend 354 pb (SEQ ID NO:5), insérées en NotI dans 25 VP16).

-pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court (insert  $\beta$ ATIP $c^{stop,E}$  inséré en BamHI-EcoRI dans pCDNA3-MYC (pcDNA3 d'Invitrogen, modifié par insertion de la séquence MYC, figure 7) ; ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires. Il permet d'exprimer MYC-ATIPsouris-court en cellules eucaryotes. L'expression de cette protéine dans des cellules eucaryotes après transfection du plasmide correspondant a déjà été obtenue et vérifiée par immunoréaction avec un anticorps anti-MYC et anti-ATIP.

-pRSETA-HIS-ATIPsouris-court (insert  $B_{ATIP}c^{stop,E}$  inséré en BamHI-EcoRI dans pRSETA, Invitrogen). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine de fusion HIS-ATIPsouris-court en cellules bactériennes et de la purifier sur colonne de Nickel (Voir figure 6 pour le site multiple de clonage).

5 -pBacPAK-polyHIS-ATIPsouris-court (insert  $B_{ATIP}c^{stop,E}$  inséré en BamHI-EcoRI dans le vecteur pBacPAK-polyHIS (pBacPAK commercial, modifié par insertion d'une séquence contenant un tag histidine et un site de clivage à la thrombine, figure 8). Cette construction peut être utilisée pour exprimer la protéine ATIP souris-court, fusionnée à un tag histidine, dans des cellules d'insectes (type SF9). En effet, comme il est indiqué, ce vecteur contient une insertion poly-histidine et peut donc coder pour la protéine de fusion. Celle-ci, de même que la protéine de fusion clonée dans pRSET, peut-être purifiée sur colonne de Nickel et servir au même type de techniques.

10 15 -pGEX-4T1-GST-ATIPsouris-court (insert amplifié par PCR identique à  $B_{ATIP}c^{stop,E}$  mais sans codon STOP, ce qui prolonge la séquence de ATIPsouris-court des quelques acides aminés suivants: Phe-Glu-Phe-Pro-Gly-Arg-Leu-Glu-Arg-Pro-His-Arg-Asp provenant du plasmide pGEX-4T-1 (Pharmacia). Ce plasmide permet d'exprimer la protéine GST-ATIPsouris-court en cellules bactériennes et de la purifier sur billes glutathion-agarose.

20 25 -pCDNAI-ATIPsouris clone1 (totalité du 5' séquencé de ATIP et ORF jusqu'à pb: 1205 en partant du début du clone, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide est issu du clonage de la banque de fœtus de souris avec la sonde SEQ ID NO:5. Ce plasmide peut servir à produire en bactéries, la portion 5' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

-pCDNAI-ATIPsouris clone 2 (2ème moitié de l'ORF de ATIP à partir de pb: 616 et jusqu'à la fin du 3' séquencé (pb 1803), inséré en BstXI dans pcDNAI, Invitrogen). Ce plasmide peut servir à produire en bactéries, la portion 3' de l'ADN ATIPsouris, pour l'utiliser comme sonde.

30 -pcDNAI-ATIPsouris-long (clones 1 et 2 mis bout à bout, en

utilisant le site intermédiaire SapI. Ce plasmide contient la totalité du clone ATIP souris, inséré en BstXI dans pCDNAI). Ce plasmide peut être utilisé en transfections transitoires en cellules eucaryotes.

-pcDNA3-ATIPsouris-long (ATIPsouris entier sorti BamHI-

5 XbaI de pCDNAI-ATIPsouris-long, et inséré dans pcDNA3, Invitrogen, à ces mêmes sites). Ce plasmide peut être utilisé en transfections stables ou transitoires en cellules eucaryotes. Il a permis de traduire *in vitro* (kit TNT T7 *coupled reticulocytes lysate systems*, Promega) la protéine ATIP entière et de constater que son produit de traduction a un poids moléculaire apparent sur 10 gel de 58 kDa. A ce produit majoritaire s'ajoute deux produits minoritaires de 30 et 15 kDa. D'après la séquence de ATIP, ceux-ci pourraient correspondre à des produits partiels de traduction *in vitro* commençant à d'autres ATG que celui en position 178 de la SEQ ID NO:1.

**EXEMPLE 4 : Obtention de clones stables exprimant la protéine ATIPsouris-court ou long.**

On a obtenu par transfection des clones stables exprimant à la fois le récepteur AT2 humain et l'ATIP souris court (SEQ ID NO:6) ou l'ATIP souris long (SEQ ID NO:3).

Les cellules CHO, déficientes en dihydrofolate réductase, sont 20 transfectées avec un plasmide contenant la région codant pour le récepteur AT2 humain (Bedecs et al., *Biochem. J.* 1997, 325, 449-454).

Le clone sélectionné, CHO-hAT2, exprimant 100 fmol de récepteur AT2/mg de protéine, est cultivé sur milieu HAMF12 complémenté avec du sérum de veau fœtal à 10 % et utilisé entre les passages 10 et 30.

25 Ce clone a lui même été transfecté avec les plasmides pCDNA3-MYC-ATIPsouris-court ou pCDNA3-ATIPsouris-long décrits à l'exemple 3. La sélection des clones exprimant, de manière stable, la protéine ATIP (forme courte ou forme longue) s'est faite en milieu sélectif contenant 800 µg/ml de G418. Les lysats cellulaires, correspondant aux différents clones 30 sélectionnés, ont été soumis à un SDS-PAGE suivi d'une immuno-empreinte et

celui-ci a été incubé avec l'anticorps polyclonal anti-ATIP. Les résultats obtenus indiquent que différents clones exprimant des taux différents d'ATIP souris court, ont pu être obtenus.

**EXEMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la séquence**

5 SEQ ID NO:6.

Afin de progresser dans la caractérisation de ce clone, la production d'anticorps polyclonaux dirigés contre le domaine ATIP a été entreprise.

Pour cela, un vecteur codant pour une protéine correspondant

10 à ce domaine fusionné à six résidus histidine a été construit.

La séquence suivante :

GGA TCC-SEQ NO:5-TAG-TGA-ATT

est insérée dans le plasmide pRSETA, tel que défini ci-dessus.

Dans cet insert, la SEQ ID NO:5 ne comprend pas le premier

15 CAT.

Le plasmide obtenu est exprimé dans la souche d'*E. coli* BL 21 (DE3) ( $F^-$   $ompT^-$   $rB^-$   $mB^-$ ) contenant le bactériophage DE3 qui porte un fragment d'ADN contenant le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5*, le début du gène *lacZ* et le gène codant pour la T7 ARN polymérase. Ce fragment est introduit 20 dans le gène *int*.

En présence de DE3, seul le promoteur *lacUV5*, inductible par IPTG dirige la transcription de la T7 ARN polymérase.

L'addition de 0,4 mM d'IPTG à une culture de cellules BL21 (DE3) induit la production de T7 ARN polymérase qui, à son tour, entraîne la 25 transcription de l'ADN cible du plasmide pRSETA (permettant la traduction de la protéine se liant au récepteur AT2).

La protéine obtenue (17 kDa) est purifiée sur colonne de Nickel (Ni-NTA, QuiAexpressionist 07/97, Quiagen), grâce à l'affinité de ses 30 six résidus histidine pour le nickel. La protéine obtenue est ensuite injectée à des lapins pour obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine

ATIP. Les saignées obtenues présentent un très bon titre.

Ces anticorps purifiés sur colonne de GST-ATIP, après passage sur colonne de GST seul (afin d'éliminer les éventuels anticorps spécifiques de GST et de ne retenir sur la colonne de GST-ATIP que les anticorps spécifiques de ATIPsouris-court) peuvent être utilisés avec succès pour immuno-précipiter et révéler en immuno-empreinte MYC-ATIPsouris-court à partir de cellules COS transfectées de façon transitoire. De plus cet anticorps purifié révèle également en immuno-empreinte la protéine ATIPsouris-long contenue dans des lysats de cellules COS transitoirement transfectées avec le plasmide pCDNA3-ATIPsouris-long.

La protéine ATIPsouris-long transfectée est visualisée après SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-ATIP, sous la forme de deux polypeptides de poids moléculaires apparents de 50 et 45 kDa.

Cet anticorps purifié a été utilisé en immuno-fluorescence sur des cellules CHO-hAT2, fixées par un traitement de 15 minutes en paraformaldéhyde (3 %). Après fixation, les cellules sont traitées successivement par des solutions de PBS/glycine 50 mM pendant 20 minutes, PBS/Triton X100 0,1 % pendant 5 minutes et PBS/BSA 0,2 % pendant 15 minutes. Elles sont ensuite incubées successivement dans des solutions à 15 µg/ml d'anticorps contenant l'anticorps anti-ATIP purifié, puis l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à de la rhodamine pendant 30 minutes. Entre chaque nouvelle incubation, trois rinçages en PBS sont effectués. Les observations au microscope à fluorescence indiquent une expression de la protéine ATIP endogène au niveau du noyau (de façon majoritaire) et du cytoplasme des cellules CHO-hAT2.

Certaines cellules montrent une répartition homogène de la fluorescence due à l'anticorps anti-ATIP dans ces compartiments, alors que d'autres cellules qui paraissent plus étalées, montrent une répartition hétérogène de la fluorescence le long de filaments qui semblent partir du noyau et s'étendre jusqu'à la membrane plasmique de la cellule, en un réseau organisé.

Des expériences complémentaires de co-localisation doivent être effectuées pour déterminer si ces filaments coïncident ou non avec des structures connues du cytosquelette.

**EXEMPLE 6 : Confirmation de l'interaction *in vitro* de la protéine**

**5 ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2.**

Pour démontrer l'interaction de la protéine ATIPsouris-court avec l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 dans un autre système que celui du double hybride, un protocole permettant de mettre en évidence cette interaction *in vitro* a été mis en place. Pour cela, la protéine de fusion GST-10 ATIP telle que décrite ci-dessus a été produite ; elle est associée par sa partie GST à de la glutathione couplée à des billes d'agarose (GA). En parallèle, des bactéries (DH5 $\alpha$ ) sont transfectées avec un plasmide (pMAL-c2-AT2, issu de pMAL-c2 de New England Biolabs) codant pour une protéine de fusion entre l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 humain (Asn314-Ser363) et la MBP (Maltose Binding Protein). Ces bactéries ont été cultivées et la protéine de fusion a été induite en IPTG 0,3 mM selon le protocole "*pMAL Protein Fusion and Purification System*" de New England Biolabs. Après centrifugation de la culture à 4 000 g et solubilisation du culot obtenu en "column buffer" (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA), une nouvelle centrifugation à 9 000 g a permis de récupérer un surnageant contenant une forte concentration de MBP-AT2. Ce surnageant a été mis en contact, pendant 3 heures à 4°C, avec les billes de glutathione agarose couplées à la protéine GST seule après addition de NaCl de façon à se placer à 300 mM final NaCl. Cette étape de préincubation permet d'éliminer les interactions non spécifiques qui peuvent exister entre ATIP et GA-GST. Le surnageant récupéré a été mis en contact avec les billes GA-GST-ATIPsouris-court ou GA-GSTseul pendant une nuit à 4°C. Après contact les billes ont été rincées 3 fois en tampon 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA et une fois en "column buffer". Après analyse des billes rincées en SDS-PAGE et immuno-empreinte avec un anticorps anti-MBP 20 (New England Biolabs), on observe une rétention spécifique de la protéine 25 ATIPsouris-court.

MBP-AT2 sur billes GA-GST-ATIPsouris-court qui n'est pas observée sur les billes GA-GSTseul (Figure 10).

5 Ce même protocole a été réalisé avec un plasmide exprimant MBP-AT1 (extrémité C-terminale du récepteur AT1 humain (Leu297-Glu359)) et indique que la protéine MBP-AT1 n'est pas retenue de façon spécifique sur les billes GA-GST-ATIPsouris-court (Figure 10).

Ces résultats confirment ceux obtenus en double hybride indiquant une interaction spécifique et sélective entre la protéine selon l'invention et l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 (et pas AT1).

10 **EXEMPLE 7 : Modification de la transduction du signal du récepteur AT2 dans des clones surexprimant la protéine ATIPsouris-long.**

Afin de vérifier que la protéine ATIP interagit *in vivo* avec le récepteur AT2, on a évalué si une surexpression de cette protéine modifie un signal induit par le récepteur AT2.

15 Pour cela un clone stable de cellules CHO-hAT2 exprimant la protéine ATIPsouris-long (CHO-hAT2-ATIP), obtenu selon la méthodologie décrite dans l'exemple 4 a été utilisé ; le test fonctionnel de l'activité du récepteur AT2 mis au point sur le clone CHO-hAT2 qui consiste à inhiber la phosphorylation de la sous-unité IR $\beta$  du récepteur de l'insuline induite par 20 son ligand, a été reproduit.

**Mise en évidence d'une inhibition par le récepteur AT2 de la phosphorylation d'IR $\beta$  induite par l'insuline dans les cellules CHO-hAT2 :**

Les cellules CHO-hAT2 sont ensemencées à une densité de 3.10<sup>6</sup> cellules par boîte de 15 cm<sup>2</sup> de diamètre. Elles sont rendues quiescentes 25 par un sevrage de 16 heures avant d'être traitées. Le traitement consiste en une mise en contact de 5 minutes avec 15 ml de milieu F12 contenant de l'insuline additionné ou non de CGP42112 (agoniste sélectif du récepteur AT2). Après traitement, les cellules sont solubilisées en tampon de lyse contenant : 50 mM Hepes, pH 7.6, 1 % Triton X-100, 20 mM EDTA, 30 mM pyro- 30 phosphate de sodium, 30 mM fluorure de sodium, 2 mM benzamidine, 1 mM

sodium orthovanadate, 1 mM fluorure de phénylemethylsophonyle et 1 µg/ml d'aprotinine, pepstatine, antipain and leupeptine. Les lysats sont ensuite soumis à une purification sur colonne de lectine de germe de blé selon le protocole décrit dans Issad, T., et al. (*Eur. J. Biochem.* 1995, **234**, 108-115). Après 5 mise en contact et lavages, les billes de lectine couplée à de la sépharose (Pharmacia) sont reprises dans du tampon d'échantillon contenant du SDS et les protéines éluées sont analysées en SDS-PAGE suivie d'immuno-empreintes avec des anticorps anti-phosphotyrosine (Upstate Biotechnology, Inc.) ou anti-IR $\beta$  (décrit dans Issad, T., et al., précité).

10 La sous-unité  $\beta$  du récepteur de l'insuline apparaît comme un polypeptide de 97 kDa dont la phosphorylation (visualisée par révélation avec un anticorps anti-phosphotyrosine) augmente de façon dose-dépendante avec la concentration en insuline. L'angiotensine II (100 nM) ainsi que le CGP42112 (100 nM) inhibent cette phosphorylation à toutes les doses d'insuline testées 15 (100 nM) entre 0,1 et 0,001 µg/ml (Figure 11). A titre d'exemple, le CGP42112 inhibe la phosphorylation de IR $\beta$  induite par 0,01 µg/ml d'un facteur  $64 \pm 4\%$  ( $n=7$ ). Ce résultat démontre que le récepteur AT2 interfère négativement sur les voies de signalisation du récepteur de l'insuline à l'étape initiale de son activation, qui est son autophosphorylation. Ces résultats fournissent également la 20 première mise en évidence d'une interconnection entre les voies de signalisation des récepteurs tyrosines kinases et le récepteur à sept domaines trans-membranaires qu'est l'AT2.

Reproduction de cette méthodologie sur les cellules  
CHO-hAT2-ATIP :

25 Lorsque ce protocole est réalisé sur des cellules CHO-hAT2-ATIP, l'inhibition par le CGP42112 (100 nM) de la phosphorylation du récepteur de l'insuline obtenue pour différentes doses d'insuline (0,05, 0,01, 0,005, 0,001 µg/ml) n'est pas observée (Figure 11). Ce résultat a été 30 reproduit 3 fois pour chacune des doses d'insuline en prenant comme contrôle positif, dans chaque expérience, l'inhibition obtenue pour le clone CHO-hAT2.

Ceci démontre donc que la surexpression de la protéine ATIP dans les cellules CHO-hAT2 interfère avec la signalisation du récepteur AT2, ce qui confirme l'interaction *in vivo* de la protéine ATIP avec le récepteur AT2.

Une autre protéine glycosylée, retenue sur colonne de lectine, 5 ayant un poids apparent de 120 kDa, identifiée comme étant la protéine nouvellement clonée SIRP (Kharitonov, A. et al, Nature, 1997, 386, 181-186) est phosphorylée sur tyrosine en réponse à l'insuline. La phosphorylation de cette protéine, de même que celle de IR $\beta$  est inhibée en présence de CGP42112 dans le cas du clone CHO-hAT2 et ne l'est pas dans le cas du clone 10 CHO-hAT2-ATIP. Ceci confirme que la protéine ATIP interfère sur les voies de signalisation du récepteur AT2. Ces résultats montrent bien l'intérêt que peut présenter l'utilisation de la protéine ATIP pour modifier la signalisation médiée par le récepteur AT2 et compenser éventuellement des pathologies associées à des anomalies de la régulation de ce récepteur.

15 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en évidence, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente 20 invention.

REVENDICATIONS

1°) Fragment d'acides nucléiques isolé, codant pour une protéine apte à se lier au récepteur AT2, lequel fragment est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 et 9.

5 2°) Fragment d'une des séquences selon la revendication 1, comprenant entre 20 et 400 pb, utile comme sondes ou comme amorces, pour la détection des séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9, ou de séquences homologues.

10 3°) Fragment selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend de 20 pb à 400 pb incluses dans les séquences SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou 9.

15 4°) Fragment selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 et SEQ ID NO:12.

5 5°) Transcrits, caractérisés en ce qu'ils sont complémentaires des séquences selon la revendication 1.

6°) Protéine purifiée et isolée, apte à interagir avec le récepteur AT2, sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:2, 4, 6 ou 8, laquelle protéine est dénommée ATIP.

20 7°) Produit de traduction, caractérisé en ce qu'il est codé par une séquence nucléotidique selon la revendication 1.

8°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre une protéine ou un fragment de protéine selon la revendication 6 ou la revendication 7.

25 9°) Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon la revendication 1.

10°) Cellule hôte transformée, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur selon la revendication 9.

30 11°) Cellules hôtes transformées, caractérisées en ce qu'elles

sont constituées par une souche de levure convenable co-transformée avec au moins deux vecteurs qui codent respectivement (i) pour une protéine dite appât sélectionnée dans le groupe constitué par un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la 5 revendication 7 et un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2, laquelle protéine appât est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription et (ii) pour une protéine dite proie, sélectionnée dans le groupe constitué par 10 un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, un fragment contenant au moins l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 et tout autre polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, laquelle protéine proie est fusionnée à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le 15 domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation du même facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

12°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co- 20 transformée avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au 25 moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs 30 comportent en outre des marqueurs de sélection.

13°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon 5 la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le 10 domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection.

14°) Cellule hôte transformée selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une souche de levure convenable co-transformée avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la séquence SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon 15 la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué 20 par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour une protéine mutée.

15°) Méthode de sélection de protéines inhibitrices de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable 30 avec trois vecteurs qui codent respectivement pour (i) un appât correspondant

à un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, (ii) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la 5 protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (iii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une banque d'ADNc, lesquels vecteurs comportent en outre des 10 marqueurs de sélection,

(b) la sélection des clones de la banque d'ADNc exprimant un polypeptide inhibant l'interaction récepteur AT2-protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur un milieu sélectif approprié et

(c) l'identification dudit polypeptide.

15 16°) Méthode de criblage de polypeptides interagissant avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, laquelle méthode comprend :

(a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs tels que définis ci-dessus, à savoir qui codent respectivement pour (i) un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, et (ii) un polypeptide correspondant à une séquence contenue dans une 20 banque d'ADNc, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des marqueurs de sélection, et

(b) la sélection des clones exprimant un polypeptide interagissant 25 avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, sur

un milieu sélectif convenable.

17°) Méthode de caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2, caractérisée en ce qu'elle comprend :

5 (a) la co-transformation d'une souche de levure convenable avec deux vecteurs, à savoir (i) un vecteur codant pour un fragment contenant au moins la SEQ ID NO:5 de la protéine ATIP selon la revendication 6 mutée ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription et (ii) un vecteur codant pour un fragment contenant l'extrémité C-terminale du récepteur AT2 muté ou non, fusionné à une protéine sélectionnée dans le groupe constitué par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription et le domaine d'activation dudit facteur de transcription, lesquels vecteurs comportent en outre des 10 marqueurs de sélection, l'un des deux vecteurs codant obligatoirement pour 15 une protéine mutée et

(b) la visualisation, par sélection sur un milieu sélectif convenable, de la perte éventuelle de l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou selon la revendication 7-récepteur AT2.

20 18°) Méthode de sélection de substances aptes à influencer l'interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, laquelle méthode comprend :

25 (a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support avec une protéine de fusion récepteur AT2-protéine étiquette, éventuellement en présence d'une substance à tester,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable et

30 (c) la visualisation de l'éventuelle interaction protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7-récepteur AT2, en particulier en

SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps dirigés contre la protéine étiquette, fusionnée au récepteur AT2.

19°) Méthode de sélection de substances aptes à interagir avec la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en 5 ce qu'elle comprend :

(a) la mise en contact de la protéine ATIP selon la revendication 6 ou la revendication 7, fixée sur un support, avec un lysat cellulaire,

(b) au moins un lavage dudit support ainsi traité avec un tampon convenable,

10 (c) la visualisation de l'éventuelle protéine associée à la protéine ATIP, en particulier en SDS-PAGE, suivie d'une immuno-empreinte avec des anticorps appropriés et

(d) l'identification de la protéine du lysat cellulaire interagissant avec la protéine ATIP.

15 20°) Utilisation des cellules co-transformées selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, pour la sélection et le criblage de substances ou de protéines aptes à influencer l'interaction protéine ATIP-récepteur AT2 ou aptes à interagir avec la protéine ATIP.

LOCUS Extrémité C-terminale récepteur AT2 160 BP DS-DNA

ORGANISM Souris

BASES 41 A 33 C 36 G 50 T

ac.nucléiques 1 TGTGTTAAC CCTTCCTGTA TTGTTTGTT GGAAACCGCT  
 TCCAACAGAA CGTCCGCAGT GTGTTAGAG TTCCCATAC  
 TTGGCTCCAA GGCAAGAGAG AGACTATGTC TTGCAGAAAA  
 121 GGCAGTTCTC TTAGAGAAAT GGACACCTTT GTGTCTAAA

Traduction en acides aminés

CVNPFLYCFV GNRFQQNVRS VFRVPITWLQ GKRETMSCRK  
 GSSLREMDTFVS •

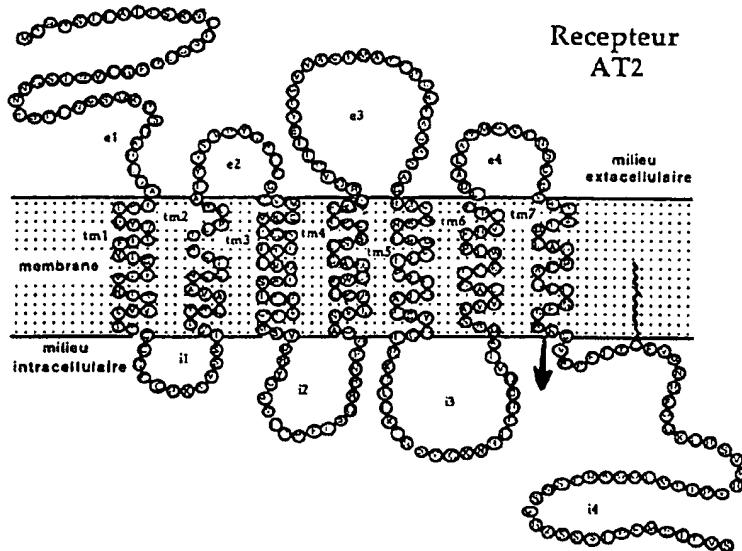


Figure 1

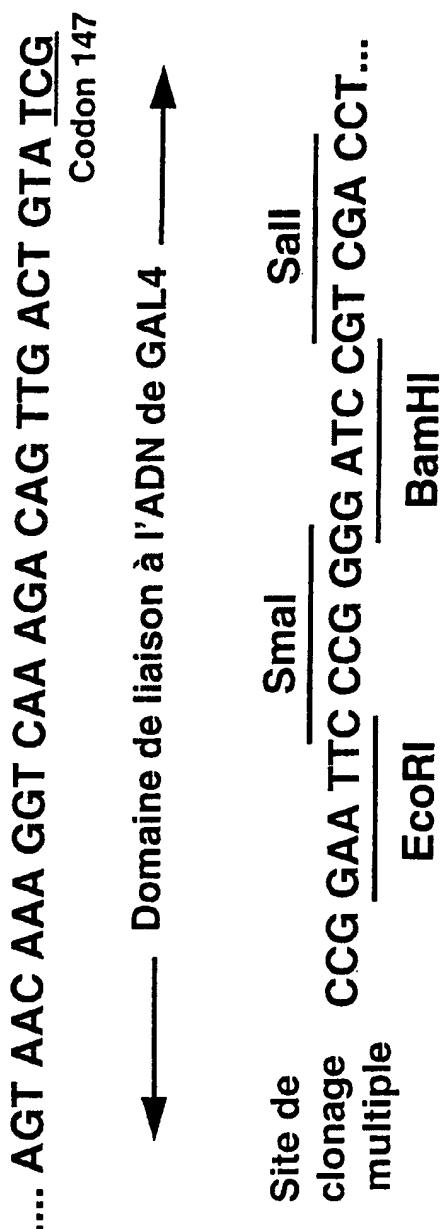


Figure 2

GCTACCCCCCCCCCACGCACCCCCAATCTGGGTGGCCTGGCATTAGCATGTAAGCTGTTTCTCTGGC	71
TGTATCTCTTGGCCTGGAAGAACCCCGAGTTGCCAAGAGACACAGTATGTGATGGTCCCTGGAAAAGCTGCT	143
M L L S P K F S L	9
TCCCCCTGCGAAGTTCTCCACTGGCTTCGAAGAC ATG CTG TTG TCT CCC AAA TTC TCC TTA	204
S T I H V R L T A K G L L R N L R L	27
TCC ACC ATC CAC GTC CGC CTA ACC 'GCC AAA GGA CTG CTT CGA AAC CTC CGG CTT	258
P S G L R K N T V I F H T V E K G R	45
CCT TCG GGG CTC AGG AAA AAC ACT GTC ATT TTC CAC ACA GTT GAA AAG GGC AGG	312
Q K N P R S L C I Q T Q T A P D V L	63
CAG AAG AAT CCC AGG AGC CTG TGC ATC CAG ACC CAG ACA GCT CCA GAT GTG CTG	366
S S E R T L E L A Q Y K T K C E S Q	81
TCC TCC GAG AGA ACG CTT GAG TTG GCC CAA TAC AAG ACA AAA TGT GAA AGC CAA	420
S G F I L H L R Q L L S R G N N K F	99
AGT GGA TTC ATC CTG CAC CTC AGG CAG CTT CTT TCC CGT GGT AAC AAC AAG TTT	474
E A L T V V I Q H L L S E R E E A L	117
GAA GCG CTG ACA GTT GTG ATC CAG CAC CTC CTG TCT GAG CGG GAG GAA GCA CTG	528
K Q H K T L S Q E L V S L R G E L V	135
AAG CAA CAC AAA ACC CTC TCT CAA GAA CTT GTC AGC CTC CGG GGA GAG CTA GTT	582
<u>1</u> A A S S A C E K L E K A R A D L Q T	153
GCT GCT TCA AGC GCC TGT GAG AAG CTA GAA AAG GCT AGG GCT GAC TTA CAG ACA	636
A Y Q E F V Q K L N Q Q H Q T D R T	171
GCG TAT CAA GAA TTT GTC CAG AAA CTA AAC CAG CAG CAT CAG ACA GAC CGG ACG	690
E L E N R L K D L Y T A E C E K L Q	189
GAA CTG GAG AAC CGG CTG AAG GAC TTA TAC ACC GCA GAG TGT GAG AAG CTT CAG	744
S I Y I E E A E K Y K T Q L Q E Q F	207
AGC ATT TAC ATT GAG GAG GCA GAA AAA TAT AAA ACT CAA CTG CAA GAG CAG TTT	798
<u>2</u> D N L N A A H E T T K L E I E A S H	225
GAC AAC TTA AAC GCC GCC CAT GAG ACC ACT AAG CTT GAG ATT GAA GCT AGC CAC	852
S E K V E L L K K T Y E T S L S E I	243
TCG GAG AAG GTG GAA TTG CTG AAG AAG ACC TAT GAA ACC TCC CTT TCA GAA ATC	906
K K S H E M E K K S L E D L L N E K	261
AAG AAG AGC CAT GAG ATG GAG AAG TCA CTG GAG GAT CTG CTT AAT GAG AAG	960
Q E S L E K Q I N D L K S E N D A L	279
CAG GAA TCG CTG GAG AAA CAA ATC AAT GAT CTG AAG AGT GAA AAC GAT GCT TTA	1014
<u>3</u> N E R L K S E E Q K Q I S R E K A N	297
AAC GAA AGG TTG AAA TCA GAG GAG CAA AAG CAA CTG TCA AGA GAG AAG GCG AAT	1068
S K N P Q V M Y L E Q E L E S L K A	315
TCC AAA AAC CCT CAG GTC ATG TAT CTG GAG CAA GAA CTA GAA AGC CTG AAG GCT	1122

Figure 3.1

4/14

V L E I K N E K L H Q Q D M K L M K	333
G TG TTA GAG ATC AAG AAT GAG AAG CTG CAC CAG CAG GAC ATG AAG CTA ATG AAG	1176
<hr/>	
M E K L V D N N T A L V D K L K R F	351
ATG GAA AAG CTG GTG GAC AAT AAC ACA GCA TTG GTT GAC AAG CTG AAG CGA TTC	1230
<hr/>	
4 Q Q E N E E L K A R M D K H M A I S	369
CAG CAG GAA AAC GAG GAG TTA AAA GCT CGC ATG GAC AAA CAC ATG GCA ATT TCA	1284
<hr/>	
R Q L S T E Q A A L Q E S L E K E S	387
AGG CAA CTT TCC ACC GAG CAG GCC GCG CTG CAA GAG TCC CTT GAG AAG GAG TCA	1338
<hr/>	
K V N K R L S M E N E E L L W K L H	405
AAG GTC AAC AAG AGA CTG TCC ATG GAG AAC GAG GAA CTT CTG TGG AAA CTG CAC	1392
<hr/>	
N G D L C S P K R S P T S S A I P F	423
AAC GGA GAC CTG TGC AGC CCC AAG AGA TCC CCC ACC TCC TCG GCC ATC CCT TTC	1446
<hr/>	
Q S P R N S G S F S S P S I S P R *	440
CAG TCC CCC AGG AAT TCT GGT TCC TTC TCC AGC CCC AGC ATC TCA CCC AGA TGA	1500
<hr/>	
CGGCTTCTGAACGCAGGAGACTCTCTGAAGGCAGTGAGGTGCGCTTCTGCAGGACTGACCCCTCTCATGGGA	1571
ACTCGAGTTGCTGCGTTAGCTCTCTGGAATATCCCAGGATATCGGGAGAGCAGCCGCCAACCGTATCAGC	1642
TACGTACGAATAGAGAGCTCAAATAGAAGACTTTAACCTGGTCCAAAAGCCTCCTCCAAAAACAGATTTC	1713
GGAAGTGAAGTGGACATAGTTGCACAAAGCACTACGGAACGAGGGAACCTTGTCTTGCCTTCAC	1784
CTAACGATAGGCTTCCAG	1803

Figure 3.2